

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003546

International filing date: 30 December 2004 (30.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2003-0099658  
Filing date: 30 December 2003 (30.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.**

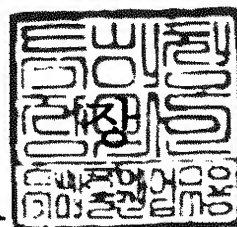
출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0099658 호  
Application Number 10-2003-0099658

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 30일  
Date of Application DEC 30, 2003

출 원 인 : 주식회사 엠디바이오알파  
Applicant(s) MD Bioalpha

2005 년 1 월 14 일

특 허 청  
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0030

【제출일자】 2003.12.30

【국제특허분류】 A61K

【발명의 명칭】 15,16- 다이하이드로탄시논 I 을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료제 조성물

【발명의 영문명칭】 diabete treatment with 15,16-dihydrotanshinone I

【출원인】

    【명칭】 주식회사 엠디바이오알파

    【출원인 코드】 1-2002-014727-9

【발명자】

    【성명의 국문표기】 박명규

    【성명의 영문표기】 PARK, Myunggyu

    【주민등록번호】 601102-1260415

    【우편번호】 449-906

    【주소】 경기도 용인시 기흥읍 서천리 Sk서그네마을APT 107동 302호

    【국적】 KR

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.  
출원인 주식회사 엠디바이오알파 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	27 면	27,000 원
【우선권 주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	0 항	0 원
【합계】	56,000 원	
【감면사유】	중소기업	
【감면 후 수수료】	28,000 원	

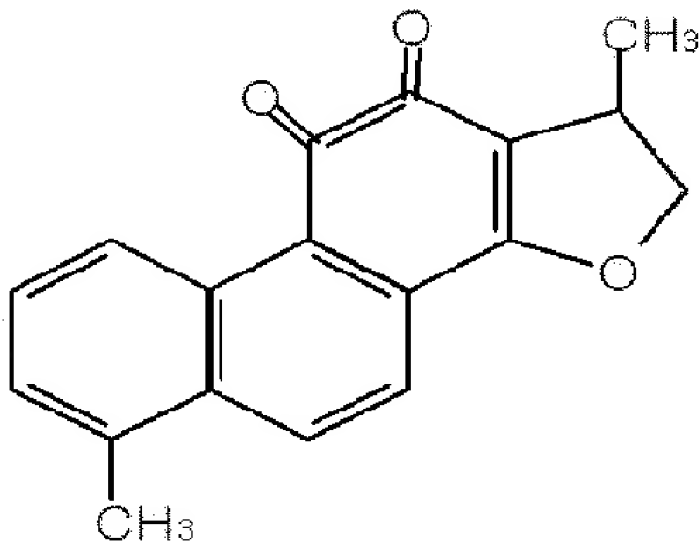
【첨부서류】 1. 중소기업기본법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류\_1통

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 5' AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성을 높이는데 우수한 활성을 나타내는 다음 화학식 1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료 조성물에 관한 것이다.

### 화학식 1



### 【대표도】

도 2

### 【색인어】

단삼, 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone), 5' AMP-활성화 단백질 인산화 효소 (5' AMP-activated protien kinase), , 당뇨병, 혈당강하

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

15,16-다이하이드로탄시논 I 을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료제 조성물{diabete treatment with 15,16-dihydrotanshinone I }

### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 단삼 추출물과 단삼에서 추출한 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 근육세포주인 C2C12 세포주에 처리하여 포도당의 흡수정도를 대조군과 비교한 막대그래프이다.

도 2는 단삼 추출물과 단삼에서 추출한 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 근육세포주인 C2C12 세포주에 처리한 후 AMPK 효소의 활성정도를 대조군과 비교한 막대그래프이다.

도 3은 단삼 추출물과 단삼에서 추출한 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 근육세포주인 C2C12 세포주에 처리한 후 세포독성을 대조군과 비교한 막대그래프이다.

도 4는 단삼 추출물과 단삼에서 추출한 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 근육세포주인 C2C12 세포주에 처리한 후 AMPK 효소의 활성정도를 대조군과 비교한 Western Blot 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

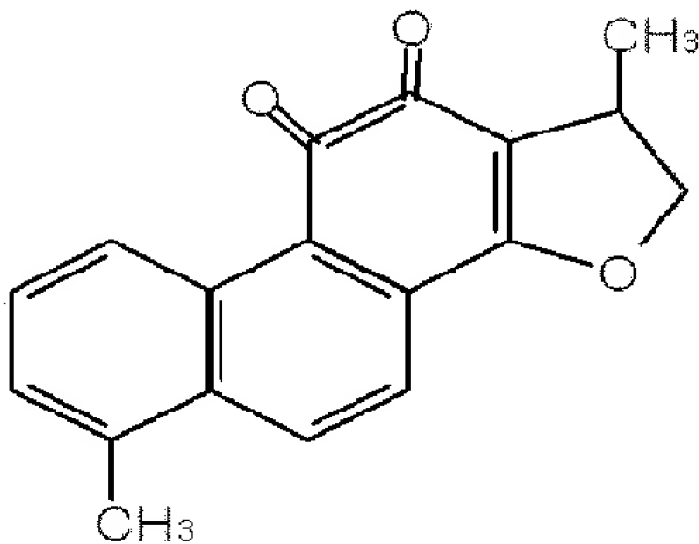
【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 5' AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성을 높이는데 우수한 활성을 나타내는 다음 화학식 1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone)을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료 조성물에 관한 것이다.

<6> 화학식 1

<7>



<8> 최근, 경제 발전에 따른 생활 수준의 향상으로 인하여 생활 여건이 향상되면서 운동 부족 현상이 초래되고 또한 전반적인 식생활의 향상으로 섭취 열량이 크게 증가하여 심각한 비만이 발생하며 이에 따라 야기 되는 제 2형 당뇨병이 증가하고 있다. 당뇨병이 오래 지속되면 혈당의 증가 이외에도 혈중 지질 농도가 증가하여 동맥 경화

, 관상 심장 질환 등의 심혈관 질환, 당뇨병성 신장 및 망막 질환등의 합병증을 유발하므로 이의 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

<9> 현재, 인슐린 저항성 (insulin resistance)이 제 2형 당뇨병의 가장 중요한 병리 기전으로 인식되고 있으며 이는 체내 인슐린이 충분하다 해도 당을 제대로 활용하지 못하는 현상을 의미하고 있으며 이를 치료하기 위해 다양한 혈당 강하제가 사용되고 있다. 혈당 강하제는 치료기전 및 작용 약물의 작용점에 따라 다음의 경우로 분류된다.

<10> 1) 설폰닐우레아 계통은 주로 췌장의 베타 세포 안에 있는 인슐린을 함유한 과립포의 이동을 촉진하여 간접적으로 인슐린을 분비 시키는 약물이며 저혈당 유발 등의 심각한 부작용이 보고 되고 있으나 최근에는 부작용을 최소화한 약물이 개발되어지고 있다.

<11> 2) 비구아나이드 계통 약물은 근육세포로 당을 이동시키고 간에서 당의 합성 (gluconeogenesis)을 억제하는 약물로 저혈당을 일으키지 않는 장점을 갖고 있으나 고령자와 심 혈관 질환 환자에게는 사용시는 주의가 요구되고 있다.

<12> 3) 알파-글루코시다아제 저해제는 소장에서 포도당을 만드는 효소 활동을 억제시켜 식후에 일시적으로 혈당이 급상승하는 것을 막아주고, 부작용이 심하지 않은 편이어서 경증 당뇨병 치료에 이용된다.

<13> 4) 최근에는 지방세포 분화에 관계되는 피피에이알 감마를 활성화하는 피페리디온계 약물도 개발되고 있다.

<14> 이러한 경구용 혈당 강하제 만으로는 혈당이 효과적으로 떨어지지 않고 이미 알려진 대부분의 약물에서 부작용이 나타나므로 보다 안전한 당뇨병 치료제 개발이 시급한 실정이다. 또한 제 2형 당뇨병은 인슐린 신호 전달 체계 및 탄수화물과 지질대사 과정에서의 다양한 문제점으로 인해 발생하기 때문에 새로운 치료제 개발을 위해서는 이러한 신호 전달 및 대사 과정을 전반적으로 조절하는 새로운 목표 단백질의 발굴이 절실한 실정이다.

<15> 최근 5'AMP 활성화 단백질 인산화 효소 (5' AMP-activated protein kinase ; AMPK)가 탄수화물 및 지질대사 그리고 포도당 흡수를 조절하는 역할이 밝혀지면서 이의 활성화 물질이 제 2형 당뇨병 치료제로서의 개발 가능성이 제시되고 있으며 이러한 근거는 다음과 같다.

<16> 1) 운동을 시킨 쥐의 근육세포에서 ATP 소모의 결과로 AMP의 양이 증가하고 이로 인해 AMPK 의 활성화도가 증가하고 그 결과 포도당 흡수가 증가하는 사실이 관찰되었다 .

<17> 2) AMPK에 의해 포도당 흡수가 증가되는 기전은 인슐린 신호 전달 체계와 독립적이며 이 사실은 인슐린 신호 전달 체계에 이상이 발견되는 대부분의 제 2형 당뇨병 환자에서 새로운 치료 목표 물질이 될 수 있다는 사실을 의미한다.



<18> 3) 실제로 제2형 당뇨 환자들의 대부분이 운동을 함으로써 혈당량을 감소할 수 있으며 당뇨 모델 동물에서 운동에 의해 AMPK가 활성화되며 동시에 혈당량이 감소되는 사실도 보고되고 있다.

<19> 4) 이 뿐 아니라 AMPK는 생체 내에서 다양한 역할을 수행하는데 췌장세포에서 인슐린의 분비를 조절할 뿐만 아니라 지방세포에서 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 HMG-CoA reductase의 활성을 저해하여 lipogenesis 및 콜레스테롤 합성을 억제하여 비만의 조절에도 중요한 역할을 한다.

<20> 5) 최근 제 2형 당뇨병 치료제로 널리 쓰이고 있는 혈당 강하제 메포민 (Metformin)이 AMPK 효소의 활성을 높여 혈당을 강하시킨다는 보고가 있다.

<21> 그러나 AMPK의 활성화제로서 제 2형 당뇨병과 비만증에 선택적으로 효과가 있으면 또한 당뇨병 실험동물에 대하여 현저히 혈당을 감소시키는 저해물질에 대한 보고는 미비하다.

<22> 일반적으로, 새로운 성분의 약제를 개발하기 위한 여러 가지 방법론 중에서도, 기존 약제의 실험적 변형에 의한 노력보다는 전통의학에서 사용되고 있는 천연물 약제들로부터 새로운 활성 성분을 발견할 수 있는 가능성이 매우 높으며 오랫동안 사용되어 왔기 때문에 개발된 약물들에 의한 독성 염려가 적어지는 장점이 존재한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<23> 이에, 본 발명에서는 단삼에서 추출한 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone)이 세포에서 5' AMP-activated protein kinase (AMPK)을 효과적으로 활성화시키는 것으로 확인하였으며 15,16-다이하이드로탄시논 I이 세포에서 인슐린과 상관없이 포도당의 흡수를 촉진시키는 효과를 관찰하였다. 따라서, 단삼에서 추출한 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone)이 당뇨 예방 및 치료효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

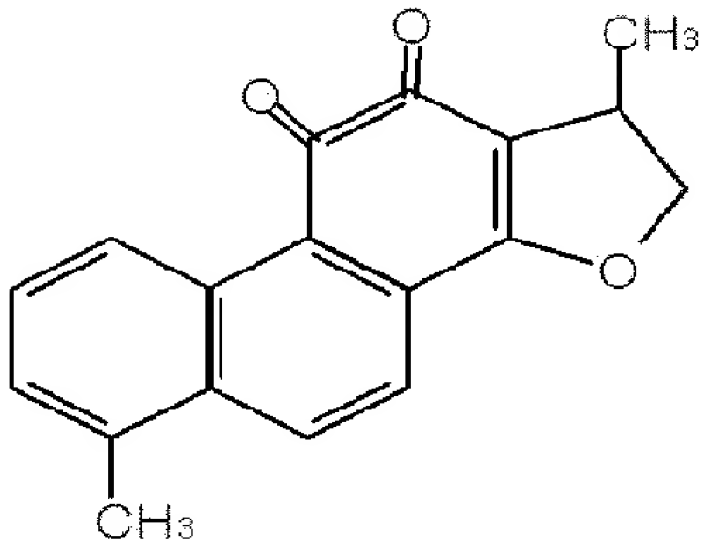
<24> 따라서, 본 발명은 근육세포인 C2C12 myotube에서 AMPK의 활성화 및 포도당흡수 촉진을 통해 당뇨 예방 및 치료효과가 있는 15,16-다이하이드로탄시논 I을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료제 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<25> 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone)과 약제학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 당뇨 예방 및 치료 조성물을 그 특징으로 한다.

<26> 화학식 1

<27>



<28> 이와 같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.

<29> 본 발명은 당뇨 예방 및 치료에 유효한 조성물로 특히 세포내에서 AMPK 활성 증가 및 포도당 흡수촉진 효과를 나타내는 상기 화학식1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료제 조성물에 관한 것이다.

<30> 본 발명이 유효성분으로 사용하는 상기 화학식 1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I 은 생약제인 단삼을 주원료로 추출할 수 있다. 이러한 추출방법은 통상적인 것으로, 먼저 메탄올로 추출하여 감압 농축한 후, 메틸렌 클로라이드로 재추출하여 얻어진 농축 용액을 실리카 칼럼 크로마토그래피로 정제함으로써 순수한 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 얻는다.

<31> 상기 화학식 1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I 은 세포내에서 AMPK를 활성화 시킴과 동시에 포도당의 흡수를 촉진시켜 혈당을 조절함을 통하여 당뇨를 치료하게 된다.

<32> 이에, 본 발명에서는 생리활성이 부여된 15,16-다이하이드로탄시논 I 에 대하여 근육세포인 C2C12 세포에서 AMPK 활성을 측정하였으며, 그 결과 이들 화합물이 우수한 활성을 보임을 확인할 수 있다. 또한, 15,16-다이하이드로탄시논 I 의 당뇨 예방 및 치료효과를 위해 근육세포인 C2C12에서 포도당의 흡수를 촉진시킴을 확인하여 매우 우수한 효과가 있음을 확인할 수 있다.

<33> 따라서, 상기 화학식 1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I 이 유효성분으로 함유되어 있는 당뇨 예방 및 치료제 조성물은 AMPK의 활성화를 통하여 당뇨를 예방 및 치료할 수 있음으로 인하여 당뇨와 관련된 각종 질병에 대한 다양한 약제로의 개발이 가능하리라 사료된다. 본 발명에 따른 당뇨 예방 및 치료제 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 유효성분으로 함유하고, 여기에 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 필요에 따라 당뇨 예방 및 치료제로 제조할 수 있다.

<34> 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과

같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 당뇨 예방 및 치료제의 약학적 조성물은 상기 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 유효 성분으로 함유한다. 상기 15,16-다이하이드로탄시논 I 은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 15,16-다이하이드로탄시논 I 은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 15,16-다이하이드로탄시논 I 에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<35> 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 15,16-다이하이드로탄시논 I 의 유효용량은 농도 의존적이나 바람직하게는 0.1mg 내지 1g/kg이고, 더욱 바람직하기로는 0.4 내지 200 mg/kg이며, 하루 1-6 회 투여될 수 있다.

<36> 또한, 본 발명은 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 유효성분으로 함유하는 당뇨 예방 및 치료용 건강식품 조성물을 제공한다. 본 명세서에서 건강식품이란 일반 식품에 15,16-다이하이드로탄시논 I을 첨가함으로써 일반 식품의 기능을 향상시킨 식품이며, 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 일반식품에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조할 수 있다. 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오고, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하였기 때문에 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

<37> 본 발명의 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 식품 또는 음료의 제조 시에 원료에 대하여 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 5 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의

섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로 조절할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강식품은 상기 약학적 조성물로 이용하는 경우는 측정된 독성 범위내의 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 함유되도록 하는 것이 바람직하다.

<38> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 구체적으로, 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 함유하는 건강 식품으로는 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 주성분으로 만든 즙, 차, 젤리, 주스 등의 건강식품 및 기호품을 들 수 있으며, 부종, 신장염, 요도염 등을 목적으로 하는 민간요법제 등을 들 수 있다.

<39> 이하, 본 발명을 다음의 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠지만 본 발명의 범위가 다음 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<40> **실시예 1: 15,16-다이하이드로탄시논의 분리**

<41> 단삼으로부터 15,16-다이하이드로탄시논의 분리는 *planta acta* 63, 339-342, (1997)의 방법에 의거하여 다음과 같이 분리 정제하여 사용하였다.

<42> 단삼 (

*S. miltiorrhiza*)은 안동의 한약재상에서 구입 (5 kg)하여 재료로 사용하였으며, 그 이외의 재료들은 약재상에서 구입하거나 채집하였다. 단삼은 메탄올 50 ℓ로 24 시간 용출시킨 후 감압 농축하였다. 여기에, 물 1500 ml를 첨가하고 동량의 n-헥산, 디클로로메탄 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 에틸아세테이트 (EtOAc)를 넣어 차례로 2회 반복 추출하여 겔 (gel) 상태의 붉은색 추출물을 얻었다. 각각의 층을 대상으로 활성을 검증한 결과 디클로로메탄 층에서 활성이 가장 높았다. 디클로로메탄 분획물을 알루미늄옥사이드에 혼합하여 컬럼에 충전하였다. 디클로로메탄/메탄올 (2:1)로 용출시킨 후 디클로로메탄/메탄올 (1:1)로 세척하여 두 분획을 혼합 농축하여 다음과 같이 정제하였다.

<43> 실리카 겔 [Merck. Kieselgel 60, 230~460 mesh]을 100% n-헥산으로 충분히 스웰링 (swelling)한 후 컬럼 (5×35 cm)에 패킹 (packing)하였다. 여기에 디클로로메탄/메탄올 용출 분획을 실리카 컬럼에 로딩 (loading)하였다. 시료 로딩 후 충분히 용출시킨 다음,  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3 = 1/1000 (\text{v/v}) \rightarrow 1/4 (\text{v/v})$ 으로 단계적 용출하여 하였다. 디클로로메탄/메탄올 (100:1)에서 용출된 분획을 모아 다시 실리카겔 컬럼에 로딩하여 헥산/에틸아세테이트 (5:1)에서 용출시켜 AMPK 효소 활성 분획을 모아 감압 농축하였다.

<44> 그런 다음, EtOAc/n-헥산 = 30/70 (v/v) 전개용매 하에서 Prep-TLC를 수행하였다. 각 단계에서 TLC를 수행하여 각 분획의 분리 정도를 관찰하고 전개용매는 노말 페이스 (normal phase)에서 EtOAc/n-헥산 = 80/20 (v/v)을 사용하였다. 각 물질의 검색은 아니스알데하이드 염색 용매 (5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2.5% 아세트산, 5% 아니스알데하이드, 87.5% 에탄올)를 사용하여 TLC 플레이트 (plate)를 핫 플레이트 (hot plate)에서 가열하여 발색시켰다. 이상과 같은 방법으로 활성물질을 추출하고 분리 정제하였다.



<45> **실시에 3 : 포도당 흡수도 분석**

<46> 근육세포인 C2C12 세포를 10% bovine calf serum이 들어있는 DMEM에서 세포배양한다. 세포밀도가 약 85 ~ 90% 가량 되면 1% bovine calf serum 배양액으로 치환하여 세포분화를 유도시킨다. 완전히 분화된 세포를 5mM 의 glucose 가 포함된 Krebs-Ringer Buffer (KRB) 로 2시간 더 배양한다. 단삼추출물 그리고 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 일정 시간 처리한 후 0.2  $\mu$ Ci 2-deoxyglucose 를 첨가하고 2분동안 방치한다. KRB buffer를 제거한 후 ice-cold PBS로 세번 세포를 세척한 후 0.5N NaOH를 사용하여 세포를 용해시키고 방사선 계측기를 이용하여 cpm을 측정한다. 이 경우 non-specific glucose uptake는 10 $\mu$ M 의 cytochalsin B를 포함한 KRB buffer로 측정하여 전체 값에서 제거한다.

<47> 도 1에서 보듯이 C2C12 세포에 단삼 추출물을 50 mg/ml 의 농도로 처리하였을 경우 대조군에 비하여 근육세포주에서 포도당의 흡수가 270% 증가하며, 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 5 ug/ml 의 농도로 처리하였을 경우 대조군에 비하여 근육세포주에서 포도당의 흡수가 150% 증가함을 관찰할 수 있었다.

<48> **실시에 3 : AMPK 효소의 활성 측정**

<49> 근육세포인 C2C12 세포를 10% bovine calf serum이 들어있는 DMEM에서 세포배양한다. 세포밀도가 약 85 ~ 90% 가량 되면 1% bovine calf serum 배양액으로 치환하여 세

포분화를 유도시킨다. AMPK 의 효소 활성 측정은 C2C12 세포를 lysis 시켜 단백질 추출물을 얻은 후 final concentration 이 30% 되게 암모니움 설페이트를 넣고 단백질을 침전시킨다. 단백질 침전물을 버퍼 (62.5 mM Hepes, pH 7.2, 62.5 mM NaCl, 62.5 mM NaF, 1.25 mM Na pyrophosphate, 1.25 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 200  $\mu$  M AMP)에 녹인 후 200  $\mu$  M SAMS peptide (HMRSAMSGLHLVKRR : acetyl-CoA carboxylase 의 AMPK phosphorylation 부위로써 밀줄친 serine 잔기가 인산화 자리) 와 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 를 첨가하여 10분간 30°C에서 반응시킨후 p81 phosphocellulose paper에 반응용액을 spotting 한다. p81 용지를 3% 인산용액으로 세척한 후 radioactivity 를 측정한다. 매 조건마다 SAMS peptide 가 들어있지 않은 반응을 수행하여 background를 빼준다.

<50> 도 2에서 보듯이 단삼 추출물을 근육세포주에 처리하면 AMPK 효소의 활성이 최고 1.7배까지 증가하며, 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 근육세포주에 처리하면 AMPK 효소의 활성이 최고 1.5배까지 증가함을 관찰할 수 있었다.

<51> **실시예 4 : 세포독성 측정**

<52> 근육세포인 C2C12 세포를 10% bovine calf serum이 들어있는 DMEM에서 세포배양한다. 세포밀도가 약 85 ~ 90% 가량 되면 세포독성을 측정하는 용액을 넣어 세포 활성 정도를 측정한다.

<53> 도 3에서 보듯이 15,16-다이하이드로탄시논 I 을 근육세포주에 처리하면 세포독성이 없음을 관찰할 수 있었다.

<54> **실시예 5 : AMPK 효소의 발현 측정**

<55> 근육세포인 C2C12 세포를 10% bovine calf serum이 들어있는 DMEM에서 세포배양 한다 . 세포밀도가 약 85 ~ 90% 가량 되면 1% bovine calf serum 배양액으로 치환하여 세포분화를 유도시킨다. AMPK 의 효소 활성 측정은 C2C12 세포를 lysis 시켜 단백질 추출물을 얻은 후 Western Blot으로 측정하였다.

<56> 도 4에서 보듯이 단삼 추출물과 15,16-다이하이드로탄시논 I을 근육세포주에 처리하면 AMPK 효소의 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다.

<57> **실시예 5 : 정제의 제조**

<58> 15,16-다이하이드로탄시논 I	600 g
<59> 아르기닌	240 g
<60> 결정셀룰로오스	140 g
<61> 스테아르산 마그네슘	10 g
<62> 하이드록시프로필메칠셀룰로오스	10 g

<63> **실시예 6 : 분말제의 제조**

<64> 15,16-다이하이드로탄시논 I	10 g
<65> 옥수수 전분	50 g
<66> 카르복시 셀룰로오스	40 g
<67> 총 량	100 g

<68> 상기에서 나열된 성분들을 잘게 부쇄 혼합하여 분말을 제조하였다. 젤라틴으로 이루어진 경질 캡슐에 분말 500 mg을 넣어 캡슐제를 제조하였다.

<69> **실시예7.** 15,16-다이하이드로탄시논 I 의 우유에의 적용

<70> 우유	99g
<71> 15,16-다이하이드로탄시논 I	1g

<72> **실시예8.** 단삼 추출물의 오렌지쥬스에의 적용

<73> 액상과당-----	5%
<74> 폴리덱스트로스-----	1%
<75> 구연산-----	5%
<76> 비타민C-----	0.02%
<77> 단삼 추출물 -----	2%
<78> 오렌지과즙농축액-----	25%
<79> 물-----	67%

<80> 실시예9... 음료의 제조

<81> 젖산칼슘	50 mg	
<82> 구연산	5 mg	
<83> 니코틴산아미드	10 mg	
<84> 엽산리보플라빈나트륨	3 mg	
<85> 엽산피리독신	2 mg	
<86> 아르기닌	30 mg	
<87> 15,16-다이하이드로탄시논 I		100 mg
<88> 물	200 ml	

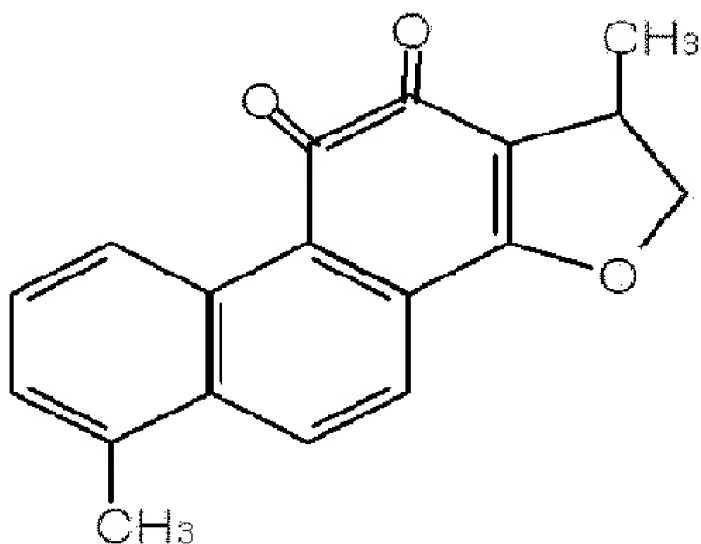
【발명의 효과】

- <89> 상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 15,16-다이하이드로탄시논 I 은 AMPK를 활성화시키는 물질로 유효하므로, 15,16-다이하이드로탄시논 I 은 당뇨 예방 및 치료제 조성물의 유효성분으로 유용하다.
- <90> 또한, 15,16-다이하이드로탄시논 I 은 포도당의 흡수를 촉진시켜 혈당을 조절함으로써 당뇨로 인하여 발생하는 각종 질병들을 예방하거나 치료할 수 있는 식품, 화장품, 의약품 조성물로 개발될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 화학식의 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone) 을 유효성분  
으로 하여 치료 및/또는 예방적 유효량 이상을 함유하는 당뇨 예방 및/또는 치료용  
조성물



【청구항 2】

단삼 (*S. miltiorrhza*) 추출물을 유효성분으로 하여 치료 및/또는 예방적 유효량 이상  
을 함유하는 당뇨 예방 및/또는 치료용 조성물

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 5' AMP-activated protein kinase  
(AMPK)의 활성을 증가시키는 것임을 특징으로 하는 조성물

**【청구항 4】**

제 3 항에 있어서, 상기 조성물은 5' AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성을 증가시켜 혈액 내 당의 세포 흡수를 촉진하여 혈당을 강하하는 것임을 특징으로 하는 조성물

**【청구항 5】**

제 1 항 내지 제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 것임을 특징으로 하는 당뇨 예방 및/또는 치료용 조성물

**【청구항 6】**

제 5 항에 있어서, 유효성분의 함량이 성인 체중 1Kg 당 0.1 ~ 6,000 mg/일 범위로 투여됨을 특징으로 하는 조성물

**【청구항 7】**

제 5 항의 조성물을 포함하는 당뇨 예방 및/또는 치료용 제제

**【청구항 8】**

제 7 항에 있어서, 상기 제제는 적어도 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 것임을 특징으로 하는 제제

**【청구항 9】**

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 제제는 정제, 산제, 경질 또는 연질의 캡셀제, 현탁제, 주사용 제제, 유화액, 비경구 투여용의 단위 투여형 또는 수회 투여형 인 것임을 특징으로 제제

【청구항 10】

제 1 항 내지 제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 식용음료 또는 식품의 형태로서 제제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 것임을 특징으로 하는 당뇨 예방 및/또는 치료용 조성물

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 유효성분의 함량이 0.0001 내지 10 중량% 범위로 포함됨을 특징으로 하는 조성물

【청구항 12】

단삼 (*S. miltiorrhza*) 으로부터 a) 물 또는 유기용매 추출하여 조 추출액을 얻는 단계  
b) 상기 조 추출물을 여과한 후 (감압)농축하는 단계 및 c) 선택적으로, 용매를 제거하는 단계를 포함하는 단삼 추출물 또는 15,16-다이하이드로탄시논 I (15,16-dihydrotanshinone) 의 제조방법

【청구항 13】

제 12 항에 있어서, 상기 단삼은 건조약재 또는 생약재인 것임을 특징으로 하는 제조방법

【청구항 14】

제 12 항 또는 제 13 항에 의해 제조된 단삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 것임을 특징으로 하는 당뇨 예방 및/또는 치료용 조성물

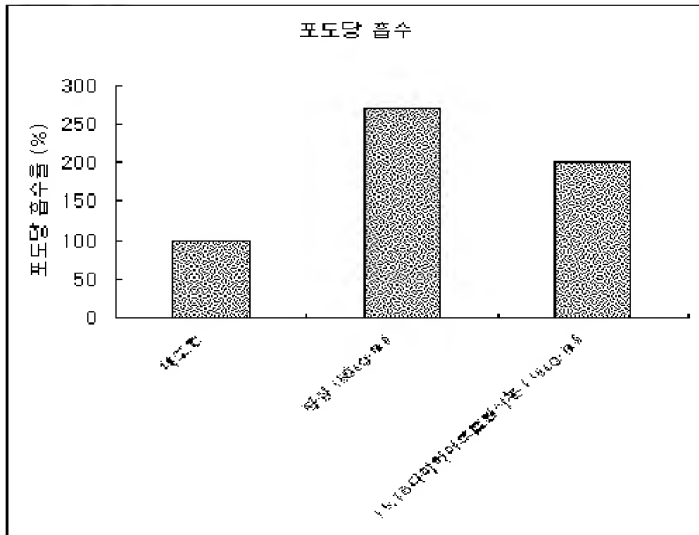


【청구항 15】

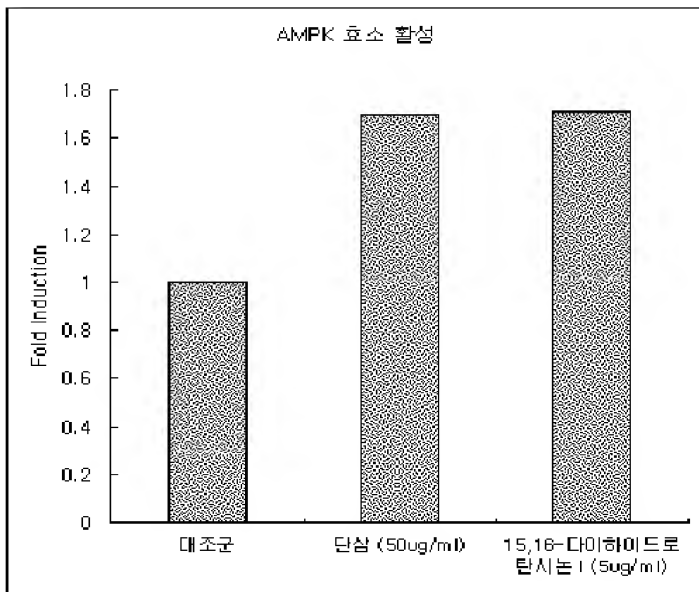
제 12 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해서 제조된 당뇨 예방  
및 /또는 치료 활성 분획물

【도면】

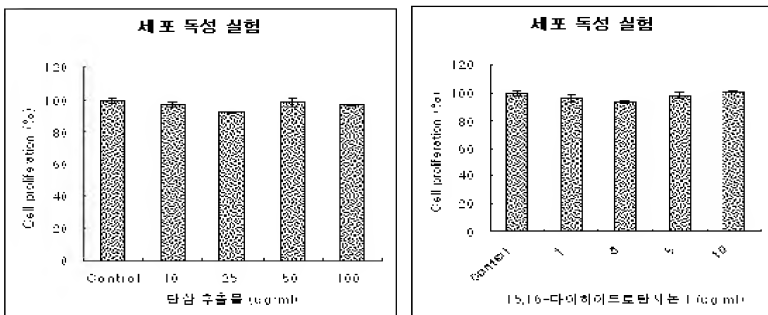
【도 1】



【도 2】



【도 3】



【도 4】

